



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, G01N 33/53, 33/50, A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/66729</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02831</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月28日(28.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/123561 1999年4月30日(30.04.99) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 宮田敏男(MIYATA, Toshio)[JP/JP] 〒259-1117 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101 Kanagawa, (JP)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 黒川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)[JP/JP] 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MEG-3 PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 メグー3タンパク質</p> <p>(57) Abstract A DNA expressed in mesangial cells at a high frequency; and a protein (Meg-3) encoded by this DNA. These substances are useful in identifying mesangial cells and detecting abnormalities, etc. in mesangial cells. Moreover, it is expected that the functions of mesangial cells will be disclosed on the basis of the function of the above protein and thus pathogenesis of diseases relating to mesangial cells will be clarified. Also, above substances are expected as being applicable to the treatment and diagnosis of diseases relating to mesangial cells, etc.</p>		

(57)要約

本発明は、メサングウム細胞で高頻度に発現している DNA、そしてこの DNA がコードするタンパク質（メグー 3）を提供する。これらは、メサングウム細胞の同定、メサングウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサングウム細胞の機能が明らかになり、メサングウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサングウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

### メグー 3 タンパク質

#### 技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

#### 背景技術

体内の 60 兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノム DNA を有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

メサンギウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そしてメサンギウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。従って、メサンギウム細胞で発現している遺伝子を見いだしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットでは Thy1 抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。また、メサンギウム細胞は活性化されると  $\alpha$  平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝

子もメサングウム細胞特異的ではない。このように、メサングウム細胞に特徴的な遺伝子については、従来報告がなかった。

なお本発明者は、先にメサングウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している (J. Clin. Invest, 1998 Aug 15, 120:4, 828-36)。本発明は、このメグシンとも明確に異なった構造を持つ新規なタンパク質に関する。

### 発明の開示

本発明は、メサングウム細胞で高度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

本発明者は、ヒトメサングウム細胞のインビトロ培養物から mRNA を単離し、3' 側の cDNA ライブラリーを作成した。そしてこの cDNA ライブラリーに含まれる多数のクローンをランダムに選択してその塩基配列を決定した。次いで決定した塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の 3' 側の cDNA クローンの塩基配列と比較することによって、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンを選択した。そしてメサングウム細胞から調製した  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーを、このクローンのインサートをプローブとしてスクリーニングし、ポジティブクローンの全塩基配列 (3768bp) を決定して本発明を完成した。更に Kozak の翻訳開始コドンを含む最も長いオープンリーディングフレームに基づくアミノ酸配列を決定した。この推定アミノ酸配列を持つ本発明によるタンパク質を、本発明者はメグー 3 (Meg-3) と命名した。ヒト・メグー 3 の cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、ヒト・メグー 3 の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示した。配列番号：1 に示す塩基配列に対して相同性を持つ塩基配列は、配列番号：1 の 3' 末端から 300 ～ 500 塩基に対して 90 % 以上のホモロジーを持つ EST が検索された他には確認することができなかった。

このアミノ酸配列について、SwissProt データベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、メグー 3 が新規なタンパク質であることを確認した。更に本発

明のメグー 3 の推定アミノ酸配列についてモチーフ検索を試みたところ、N 末端から数えて 500 番目以降の領域において、proline rich protein と呼ばれる多くのタンパク質と良く似たアミノ酸配列が見出された。特に 621 番目～701 番目に至る 81 アミノ酸残基からなる領域は、プロリンに富み (27.2%)、SH3 (Src homology 3) ドメインに結合する proline rich ペプチド (PR ペプチド) のアミノ酸配列 (xPxPPPFxP) に類似するアミノ酸配列 (xPESPPPAxP) を 2ヶ所に有する。このことから、メグー 3 タンパク質の C 末端構造は、PR ドメインとして Src ファミリーなどの細胞内シグナル伝達物質の SH3 ドメインに結合できる可能性、そしてシグナル伝達系に関与する可能性が示唆された。配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質の細胞質局在の可能性が高い (52.2%) ことから、メグー 3 がシグナル伝達に関与する可能性が大きいことが示唆される。この領域の他 (N 末端から 1～550 番目のアミノ酸) では、特に相同性の高いアミノ酸配列を見出すことはできなかった。

ヒトの初代培養細胞においては、メグー 3 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的である。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や繊維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察される。更にノーザンブロットイングによりメグー 3 の組織分布をみたところ、メグー 3 は胎盤、次いで脾において高度な発現が観察される。その他、腎、肺、および心では弱い発現が見られ、肝、および骨格筋ではわずかな発現が観察されるのみである。脳では、メグー 3 の発現は検出できない。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は具体的には以下のタンパク質、DNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパ

ク質。

〔2〕 配列番号：2のアミノ酸配列を含む〔1〕のタンパク質。

〔3〕 〔1〕に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕 配列番号：1の塩基配列を含む〔3〕記載のDNA。

〔5〕 配列番号：1の塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、〔1〕に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

〔6〕 〔4〕に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。

〔7〕 〔4〕に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

〔8〕 〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

〔9〕 〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。

〔10〕 〔9〕に記載の形質転換細胞を培養し、〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、〔1〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔11〕 〔6〕のDNAを含むメサンギウム細胞の検出用試薬

〔12〕 〔1〕に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

〔13〕 配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する〔12〕の抗体。

〔14〕 抗体がモノクローナル抗体である〔13〕の抗体。

〔15〕 〔13〕または〔14〕のいずれかに記載の抗体と〔2〕のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔2〕のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

〔16〕 〔12〕～〔14〕のいずれかに記載の抗体を含む、メサンギウム細胞の

検出用試薬。

〔17〕生体試料中に含まれる〔2〕のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。

〔18〕メグー 3 をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔19〕非ヒト脊椎動物がマウスである〔18〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔20〕メグー 3 をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔19〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

前記課題を達成するために本発明者は、3' 領域 cDNA ライブラリー (3'-directed cDNA library) を用いた。この方法により、cDNA の大きさによって左右されるクローニング効率の変動を回避することができる。3' 領域の配列は遺伝子に特有なものであり、約 200~300bp の配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である (Yasuda Y., Miyata T. et al., *Kidney Int*, 1998 Jan, 53:1, 154-8)。

本発明のヒト・メグー 3 をコードする DNA は、メサングウム細胞から mRNA を調製した後、既知の方法により二本鎖 cDNA に変換することにより得ることができる。mRNA の調製はグアニジンイソチオシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al. *Biochemistry* 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger & Birkenmeier, *Biochemistry* 18, 5143 (1979)] などを用いることができる。全 RNA からの poly(A)<sup>+</sup>RNA の調製はオリゴ(dT)を結合した担体 (例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等) を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。得られた mRNA を鋳型として、3' 端にある poly(A) 鎖に相補的なオリゴ(dT)、ランダムプライマー、あるいはメグー 3 のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理することによって cDNA

(1st strand)を得ることができる。mRNA とそれに相補的な cDNA とで構成されるハイブリッドの mRNA を E. Coli RNase H で部分的に切断し、これをプライマーとして E. Coli DNA polymerase I により cDNA (2nd strand) が合成される。最終的に E. Coli DNA Ligase で処理することにより、二本鎖 cDNA を得ることができる。

ヒト・メグー 3 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサンギウム細胞 poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳形にして RT-PCR 法によりクローニングすることも可能である。また、PCR によらず、ヒト・メグー 3 遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする cDNA を得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。マウスとラット等、ヒト以外の種におけるメグー 3 のホモログについても、同様の手法により cDNA の取得が可能である。

あるいは、メグー 3 のホモログの cDNA を以下のような手法によって単離することも可能である。すなわち、前記ヒト・メグー 3 cDNA の塩基配列をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、メグー 3 のホモログをコードする cDNA を単離することができる。cDNA ライブラリーは、マウス、ラットの組織や、培養メサンギウム細胞等から抽出した mRNA を鋳型として合成することができる。あるいは、市販 cDNA ライブラリー（フナコシ製等）を用いることもできる。この他に、本発明によるヒト・メグー 3 の cDNA をもとに、オープンリーディングフレームの前後にディジェネレーティブプライマーを設計し、これを利用した PCR によってホモログの cDNA を増幅する方法を用いることもできる。

ヒト・メグー 3 ゲノムは、ゲノミックライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。ゲノミックライブラリーは、たとえばヒト B リンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3 で部分的に切断した DNA をファージベクターである EMBL3 に組み込むことにより合成することができる (Blood, vol 83, No 11, 1994: pp



3126-3131)。このようなゲノミックライブラリーについて、プラークハイブリダイゼーション法（新細胞工学実験プロトコール、秀潤社、pp79-92、参照）を行えば、目的とするゲノムを含むクローンを取得できる。プローブとしては、メグー 3 cDNA のオープンリーディングフレーム全ての領域（2202bp）、または cDNA 部分をプライマーとしてヒトゲノム DNA を PCR 法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン部分を用いることができる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサングウム細胞由来 mRNA、もしくはヒト腎臓 mRNA（Clontech 社より購入）を鋳型として、5' RACE 法（5'-Full RACE Core Set（宝酒造（株）の方法に従う））を用いて 5' UTR の配列決定を行うことができる。

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法 [Mattencci, M.D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に 1 個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じても、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1 個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

その他、本発明のタンパク質には、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、本発明によるメグー 3 と機能的

に同等なタンパク質が含まれる。なお本発明において機能的に同等とは、メグー 3 と同等の生物学的特性を持つことを意味する。本発明者は、メグー 3 にたとえば以下のような生物学的な特性を見出している。

まずメグー 3 は、SH3 ドメインとの結合性が推測される PR ドメインを備えていることから、シグナル伝達系に関与する可能性がある。SH3 ドメインは、Src ファミリーなどをはじめとして、各種細胞内シグナル伝達物質が有するドメインの一つである。配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質の細胞質局在の可能性が高い (52.2%) ことから、メグー 3 がシグナル伝達に関与する可能性が大きいことが示唆される。

またメグー 3 は、次のような発現特性を持っている。まず、ヒトの初代培養細胞においては、メグー 3 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的である。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や繊維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察される。更にノーザンブロットイングによりメグー 3 の組織分布をみたところ、メグー 3 は胎盤、次いで脾において高度な発現が観察される。その他、腎、肺、および心では弱い発現が見られ、肝、および骨格筋ではわずかな発現が観察されるのみである。脳では、メグー 3 の発現は検出できない。各組織におけるメグー 3 の発現状態は、たとえば配列番号：1 から選択された塩基配列を持つプローブによって、各組織から調製した mRNA を試料としてノーザンブロットアッセイを行うことによって知ることができる。

以上のような生物学的特性について、機能的に同等なタンパク質は、いずれも本発明によるメグー 3 を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒトのメグー 3 のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

また、本発明の DNA には、これらの機能的に同等なタンパク質をコードする DNA が含まれる。これらのタンパク質をコードする DNA は、cDNA のみならずゲノム

DNA や合成 DNA であることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNA を適宜改変したものもまた本発明の DNA に含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等にしながら、これら核酸配列のコドンを一部改変することができる。

更に、配列番号：1 に記載の塩基配列を含む DNA とハイブリダイズすることができ、かつその DNA によってコードされるタンパク質が本発明によるメグー 3 に特徴的な機能を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含まれる。ストリンジেন্টな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジেন্টな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、4×SSC、65℃でハイブリダイゼーションさせ、0.1×SSC を用いて 65℃で 1 時間洗浄する。ストリンジエンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度( $T_m$ )に応じて調整することができる。 $T_m$  はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成（塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度）によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジエンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

変異体も含め本発明による DNA の塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

このようにしてクローン化されたメグー 3 をコードする遺伝子は適当な発現ベクター DNA に組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転

換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS 細胞の場合は pEF-BOS [Nucleic Acids Research 18, 5322 (1990)], pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO 細胞の場合は pVY1 [国際公開第 89/03874 号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合タンパク質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的タンパク質を切り出すことも可能である。融合させるタンパク質としては、ヒスチジンタグ、c-myc タグ、MBP-タグ、あるいは GST-タグ等が知られている。これらのタグを融合させた状態でインサートを発現させることができるベクターは市販されている。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシェー (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。一方哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えば COS 細胞、CHO 細胞、BHK 細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

以上のようにして目的とするメグー 3 をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生されたメグー 3 は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的タンパク質であるメグー 3 の分離、精製は、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、メグー 3 を分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いたメグー 3 の製造過程における遺

伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.)に記載の常法に従って行うことができる。

この他、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいて、メグー3遺伝子を検出するためのプローブを設計することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設計することができる。与えられた塩基配列をもとに、プローブやプライマーを設計することは当業者が日常的に行っていることである。設計された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCRのような核酸の合成反応に利用することができる。プローブやプライマーに利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも15塩基、好適には25-50塩基の長さとするのが望ましい。

本発明によるメグー3遺伝子は、インサイチュハイブリダイゼーションの結果、腎臓の組織中では特にメサンギウム細胞で特異的に発現している。したがって、メグー3遺伝子に特異的にハイブリダイズする本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、メサンギウム細胞の特異的な検出を可能とするプローブやプライマーとして有用である。メサンギウム細胞は腎糸球体機能と密接に関連していることから、本発明によるオリゴヌクレオチドは、腎臓の病理学的な解析において有用なツールとなりうる。

更に本発明が明らかにしたメグー3をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、メグー3の発現を制御しうるアンチセンス核酸が提供される。本発明によるアンチセンス核酸は、メグー3のメサンギウム細胞における役割を明らかにするための重要なツールとなる。あるいはメグー3の発現亢進によってもたらされる病態の制御に有用である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位と

のハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ (A) 付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるタンパク質鎖に伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制、などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座 2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む DNA も、本発明で利用されるアンチセンス DNA に含まれる。使用されるアンチセンス DNA は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは 3' 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された DNA は、公知の方法で、所望の宿主へ形質転換できる。アンチセンス DNA の配列は、形質転換する宿主が持つ内在性遺伝子(あるいはその相同遺伝子)、またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。

アンチセンス DNA を鋳型として転写された RNA が、標的遺伝子の転写産物に対

して好ましくは 90%、最も好ましくは 95%の相補性を有するように設計する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンス DNA の長さは、少なくとも 15 塩基以上であり、好ましくは 100 塩基以上であり、さらに好ましくは 500 塩基以上である。通常、用いられるアンチセンス RNA の長さは 2.5kb よりも短い。

更に本発明が提供するメグー 3 の cDNA 塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するメグー 3 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。具体的には、特開平 6-181767 号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995),92,3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは 3' UTR に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域をいう。

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

- 1) メグー 3 の cDNA の 5' 末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりメグー 3 のプロモーター領域をクローニングする。
- 2) 制限酵素消化してメグー 3 遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分 (2 ~ 5 kbp) のプロモーター領域を含む DNA を得、塩基配列を決定する。ヒトメサングウム細胞から調製した poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型とし、メグー 3 遺伝子の 5' 末端側 cDNA 配列より選択したプライマーDNA を用いたプライマー伸長法により、転写開始点 (+1) を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。
- 3) 2) で得た DNA からメグー 3 遺伝子のコード領域を除いた DNA 断片をプラスミド上にサブクローニングし、この DNA 断片の 2 ~ 5 kbp 下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素 (CAT) 遺伝子、あるいは

は、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性のある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、PCRにより、5'末端側及び3'末端側を順次削ったメグー3遺伝子上流部分の様々な部位に該当するDNA断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としてのCAT遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞のCAT或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、メグー3遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' UTR、イントロン中のエンハンサー領域は、メグー3 cDNA をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト・メグー3のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール（秀潤社）」、「バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法（羊土社）」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリンティング法、ゲルシフト法、またはone-hybrid法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とはメグー3遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。

アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有するDNAを用い、結合した転写因子を溶出することによって、メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。



また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター（例えば  $\lambda$  gt11）に挿入した cDNA の発現産物を標識プローブによってスクリーニングする。たとえばスクリーニングすべき cDNA を  $\beta$ -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現させ、これをニトロセルロース膜に吸着させる。次いで放射性同位元素で標識されたプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブにし、結合活性をもつ融合タンパク質を合成するファージを選択することによって、メグー 3 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

ゲルシフト法は、遊離の DNA がタンパク質と結合したときにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の移動度に差を生じる現象に基づいている。プロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブとし、転写因子が含まれる試料（たとえば核蛋白質抽出液）と混合して、低イオン強度の元で電気泳動分析する。転写因子の結合は、遊離の DNA とは違った移動度のバンドとして検出される。ゲルシフト法は、タンパク質の混合物から高い感度で転写因子を分離することができる。

ゲルシフト法によって得られた DNA と転写因子の複合体を、更にフットプリント法によって解析すると、転写因子の結合部位を決定することができる。フットプリント法は、DNA 上にタンパク質が結合すると DNase I の消化から保護される現象を利用している。すなわち、末端を  $^{32}\text{P}$  で標識したプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA を、転写因子の共存化で DNase I によって部分消化し、これを塩基配列決定用の変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。転写因子の無い状態で同様の処理を行った結果と比較すると、転写因子の結合によってバンドの消失が観察されることから、その結合部位の推定が可能となる。

本発明はまた、メグー 3 を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグー 3 または本発明のメグー 3 の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のメグー 3、

本発明のメグー 3 の部分ペプチド、あるいは本発明による c-myc-(His)<sub>6</sub>-Tag-メグー 3 や MBP-メグー 3 のような融合タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

本発明のメグー 3、または本発明のメグー 3 の部分ペプチドは、温血動物に対して投与による抗体産生が可能な部位に、公知の担体や希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行われる。抗体産生に用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、あるいはニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびウサギが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2～5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化メグー 3 と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

骨髓腫細胞としては例えば X-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 などが挙げられるが、X-63Ag8 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1:20～20:1 であり、PEG (好ましくは PEG1000～PEG6000) が 10～80% 程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは 30～37℃ で 1～10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗メグー 3 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばメグー 3 抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイク

ロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体) が用いられる。またはプロテイン A を加え、固相に結合した抗メグー 3 モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグー 3 を加え、固相に結合した抗メグー 3 モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗メグー 3 モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1~20%、好ましくは 10~20% の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (大日本製薬 (株))、1~10% の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株))、またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常 20~40℃、好ましくは約 37℃ である。培養時間は、通常 5 日~3 週間、好ましくは 1 週間~2 週間である。培養は、通常 5% 炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗メグー 3 抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は腹水化して得ることもできる。

本発明によるモノクローナル抗体は、メグー 3 に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10-20 アミノ酸のアミノ酸配列によ

って提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも7アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるメグー3特異的なモノクローナル抗体といえる。

抗メグー3モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

このようにして得られたメグー3を認識する本発明によるモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体は、メサンギウム細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いてメグー3を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりメグー3を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト・メグー3と検体中のヒト由来メグー3を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト由来メグー3を測定する競合法等を示すことができる。

サンドイッチ法によるメグー3の測定においては、まず、固定化抗体とメグー3とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体ーメグー3標識化抗体を形成させる2ステップ法、もしくは固定化抗体、標識化抗体およびメグー3を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、

ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3- (2-ピリジルジチオ) プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質として

はイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、あるいは $^{35}\text{S}$ 等が挙げられる。

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存すること

により、より長期にわたって保存することができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用い、発色剤として 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素に  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイジン-ジ- ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグー 3 の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

本発明におけるメグー 3 の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグー 3、あるいはメグー 3 の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。

加えて本発明は、メグー 3 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。ここでメグー 3 遺伝子とは、メグー 3 をコードする cDNA、ゲノム DNA あるいは合成 DNA を含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、メグー 3 の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサングウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、メグー 3 遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位 (エンハンサー、プロモーター、イントロン等) の一部に欠失、置換、

挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、メグー 3 遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンス RNA を用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトさせた動物、点突然変異 DNA を導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号）、胚性幹細胞（ES 細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989）。

あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系や *Saccharomyces cerevisiae* の FLP リコンビナーゼ系等の *in vivo* において部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。



マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変わることが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティング法による検出も可能である。

本発明のノックアウトマウスは、マウスメグー 3 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を

用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や8細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗メグー3抗体によるウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。各レーンは、次の抗原に対応している。

レーン1：MBP

レーン2：MBP-メグー3

レーン3：ウサギ網状赤血球を用いて *in vitro* transcription and translation にて発現させたルシフェラーゼ蛋白（Promega）

#### レーン 4 : 3 末端 c-myc 付加メグー 3

図 2 は、3 末端 c-myc 付加メグー 3 を高発現させた CHO 細胞の、共焦点レーザー顕微鏡による検鏡結果を示す写真である。中央で青色に染色されているのが核を、その周囲で緑色に蛍光染色されている部分がメグー 3 の局在を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

##### [実施例 1] ヒトメサングウム細胞の初代培養

58 才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサングウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200  $\mu\text{m}$  の孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100  $\mu\text{g/mL}$  のコラゲナーゼ (Washington Biochemical 社製) と共に 37℃ で 20 分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM HEPES、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products 社, Bedford, MA) および抗生物質 (10  $\mu\text{g/mL}$  のペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾン) を含む培地 199 (Gibco BRL 社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベートした。3 継代目に、メサングウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよび D-バリリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories 社, San Francisco, CA)、抗 VLA (very late antigen)-1, 3, 5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第 VIII 因子 (Dako 社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

##### [実施例 2] ヒト培養メサングウム細胞からの mRNA の単離

6 継代目に、グアニジンイソチシアネート (GTC) 法を用いて、全 RNA をヒトメサングウム細胞から単離した。即ち、実施例 1 の細胞の血清を含む培養液中の

メサングウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC 溶液中で溶解させた。DNA は 18 ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は  $5,000 \times g$  で 90 秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $125,000 \times g$  で 24 時間遠心分離した。RNA ペレットを TE バッファーに溶解させた。オリゴ dT セルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)<sup>+</sup>RNA を分離した。

#### 〔実施例 3〕 3' 領域 cDNA ライブラリーの構築

poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型として、pUC19 を基礎とするベクタープライマー [Norrander J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いた cDNA 合成を行った。このベクタープライマー DNA は、HincII 末端、および T テールをもつ PstI 末端を有し、MboI 部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第 2 鎖の合成の後、cDNA 配列、およびベクターの lacZ 遺伝子内の単一 BamHI 部位を、それぞれ MboI および BamHI で切断し、次に、低 DNA 濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA 挿入配列を、pUC19 クローニングサイトに隣接するプライマー (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' / 配列番号: 3 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / 配列番号: 4) を用いたペアード PCR により増幅させた。得られた短い二本鎖 DNA を、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

#### 〔実施例 4〕 メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者は、大規模な DNA 配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., Kidney International 53:154-158, 1998; K. Matsubara et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okubo et al., Nat. Gen. 2, 173 (1992))。

ヒト培養メサングウム細胞の 3' 領域 cDNA ライブラリーの大規模 DNA 配列決定を行い、ランダムに選択した 1836 個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらに FASTA プログラムを用いて DNA データバンク GenBank と比較した。様々な臓器および細胞からの mRNA をドットプロット解析することにより、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者のメサングウム細胞 cDNA ライブラリーにおいてきわめて高い頻度で検出されるいくつかのクローンが得られた。

〔実施例 5〕 ヒト・メサングウム細胞  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーのスクリーニング

実施例 2 にしたがって調製した全 mRNA から、オリゴ dT プライマーとランダムプライマーとを用いて  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーを合成した。ライブラリーの合成には市販の  $\lambda$  zip lox (Gibco BRL 社製、商品名  $\lambda$  ZIPLox EcoRI Arms) を利用した。実施例 4 で得たメサングウム細胞 cDNA ライブラリーで特に高頻度に検出される特定のクローンについて、そのインサートをプローブとして、この  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ポジティブクローンについて、挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

予想される開始コドン ATG の位置が、コンセンサス配列と一致し、最長のオープンリーディングフレーム（「the first ATG rule」を満足する）を与えた。メグー 3 cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、メグー 3 の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示す。

〔実施例 6〕 メサングウム特異的遺伝子の機能解析 (1)

SwissProt データベースで FASTA プログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、高い相同性を持った公知のアミノ酸配列はなく、メグー 3 が新規なタンパク質であることを確認した。

続いてメグー 3 のアミノ酸配列をモチーフ検索した。検索には、PSORT WWW Server (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>) を利用した。その結果、N 末端から数え

て500番目以降の領域において、proline rich protein と呼ばれる多くのタンパク質と良く似たアミノ酸配列が見出された。特に621番目～701番目に至る81アミノ酸残基からなる領域は、プロリンに富み（27.2%）、SH3(Src homology 3)ドメインに結合する proline rich ペプチド（PR ペプチド）のアミノ酸配列(xPxxPPPFxP)に類似するアミノ酸配列(xPESPPPAxP)を2ヶ所に有する。その他、メグー3には次に示すようなリン酸化酵素によるリン酸化モチーフの存在が確認された。また2つのN-ミリスチル化部位が認められた。更に推測される細胞質局在は52.2%であった。これらの事実は、メグー3がシグナル伝達因子であることを強く示唆する。

カゼイン・カイネース II リン酸化部位：14

プロテインカイネースCリン酸化部位：9

チロシンカイネースリン酸化部位：1

また、これらの事実に基づいて、733アミノ酸残基からなる上記推定アミノ酸配列がメグー3のアミノ酸配列であることが確認された。このアミノ酸配列からなるタンパク質の、計算上の分子量は約83kDa、pIの理論値は5.72である。

#### [実施例7] メグー3の機能解析 (2) ー組織分布

メグー3のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。3'領域 cDNA ライブラリー（実施例3）のポジティブクローンのインサートを、ランダム DNA ラベリングによってRI 標識しプローブとして用いた。試料として以下の細胞から単離した poly(A)<sup>+</sup>RNA (2μg) を、2.2M ホルムアミドを含む1%アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターをRapid Hyb 溶液（Amersham 社, Arlington Heights, IL）中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、60℃で、0.1×SSPE/0.1%SDS という最終ストリンジェンシーで洗浄した。

ヒトの複数の初代培養細胞および組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞株の

ノーザンブロットのための試料は、Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。初代培養細胞としては、ヒトメサンギウム細胞、ヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト腎皮質上皮細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、およびヒト平滑筋細胞の初代培養細胞由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。ヒトの癌細胞株のノーザンブロットには、前骨髄球白血病 HL-60、HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、Burkitt リンパ腫 Raji、大腸腺癌 SW480、肺癌 A549、および黒色腫 G361 由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。組織のノーザンブロットには、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、腎、および脾由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。結果は表 1 - 3 に示すとおりである。

表 1

初代培養細胞	
ヒトメサンギウム細胞	+++
ヒト皮膚繊維芽細胞	++
ヒト腎皮質上皮細胞	++
ヒト臍帯静脈内皮細胞	±
ヒト平滑筋細胞	±

表 2

ヒト癌細胞株	
前骨髄球白血病 HL-60	—
HeLa 細胞 S3	+++
慢性骨髄性白血病 K-562	+
リンパ芽球白血病 MOLT-4	—
Burkitt リンパ腫 Raji	—
大腸腺癌 SW480	+++
肺癌 A549	++
黒色腫 G361	+

表 3

ヒト組織	
心	+
脳	—
胎盤	+++
肺	+
肝	±
骨格筋	±
腎	+
脾	++

メグー 3 cDNA プローブを用いたノーザンブロット解析で、メサングウム培養細胞に単一の転写産物（約 4.0kb）が検出された。ヒトの初代培養細胞においては、メグー 3 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や皮膚繊維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては、ヒトの胎盤、次いで脾で高度な発現が観察された。その他に、心、肺、あるいは腎等の組織で発現が観察され、肝と骨格筋においては発現が弱く、脳での発現は検出できなかった。培養癌細胞株においては HeLa 細胞 S3 と大腸腺癌 SW480 で強い発現が、また肺癌 A549 でも発現が見られたが、その他の細胞株では顕著な発現は観察されなかった。

#### 〔実施例 8〕 メグー 3 の機能解析 (3) —インサイチュハイブリダイゼーション

インサイチュハイブリダイゼーション (in situ hybridization、以下 ISH と省略する) により、ヒト正常腎組織で、メグー 3 mRNA 発現を評価した。ISH は、公知の方法により行った (Kidney Int. 52, 111 (1997))。ヒト・メグー 3 cDNA の 404-433 位の塩基配列 (配列番号: 5) をプローブとして用いた。糸球体内で、メグー 3 転写産物はメサングウム細胞に局在化していた。シグナルの特異性を評価するため、ハイブリダイゼーションの前に RNase で組織を前処理すると、メグー 3 プローブで検出されるシグナルの大部分が除去された。また、100 倍過剰の



同種または無関係の未標識オリゴヌクレオチドで競合実験を行ったところ、メグー 3 のプローブに由来するシグナルは、同じ塩基配列を持つオリゴヌクレオチドでは消失したが、非同種オリゴヌクレオチドでは消失しなかった。これらの結果から、配列番号：1 に示した塩基配列を持つメグー 3 遺伝子は、メサングウム細胞で特異的に発現していることが確認できた。

#### [実施例 9] メグー 3 蛋白質の発現

メグー 3 の翻訳領域を含む遺伝子を得るために、ヒト培養メサングウム細胞 poly(A)<sup>+</sup>RNA (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1.0  $\mu$ l を鋳型とし、翻訳領域をコードするように設計したプライマー、すなわち、開始コドンを含み 5' 端に制限酵素 EcoRI 認識配列を加えたプライマー (5'-CGGAATTCATGGGGTGGATGGG-3' /配列番号：6) 及びストップコドンと EcoRI 認識配列を加えたプライマー (5'-GCGAATTCTAGAACTCAGTCTGCACCCCTGC-3' /配列番号：7) で PCR 反応をおこなった。反応条件は、10 $\times$ Ex Taq バッファー 5  $\mu$ l、dNTP 混合物 (2.5mM) 8  $\mu$ l、PCR プライマー (配列番号：6、20pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、一次 PCR A1 プライマー (配列番号：7、20pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、T aKaRa Ex TaqTM (10U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、滅菌水で全量を 50  $\mu$ l とした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94 $^{\circ}$ C 1 分、60 $^{\circ}$ C 2 分、72 $^{\circ}$ C 2 分を 30 サイクル反応させた。0.75% アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液夜中から 1  $\mu$ l を「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen 社) を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドを meg3/pCR2 とした。このプラスミドを EcoRI で切断し、EcoRI で切断したマルトース結合蛋白質融合蛋白質発現用ベクター、pMAL-c2 (New England Biolab 社) と、T4 リガーゼを用い結合し、大腸菌 JM 109 を形質転換した。18 時間後、アンピシリン耐性株を 3ml の LB 培養液に植え、18 時間培養後、ミニプレ法によりプラスミドを抽出し、制限酵素で確認し、発現ベクター、pMALc2/meg3 を得た。

pMALc2/meg3 で形質転換した大腸菌 XL1-Blue を 100  $\mu$ g/ml になるようにアンピシリンを加えた 10ml の LB 培地で 37 $^{\circ}$ C、18 時間振とう培養し、この培養液を

11 の Rich 培地 (1 L 中に 10g トリプトン、5g 酵母抽出物、5g NaCl、2g グルコースを含みアンピシリンを  $100 \mu\text{g/ml}$  になるように加えたもの) に加え  $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。濁度計にて約 0.8 OD (A600) になったところで 0.1M IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside 1.41g を水 50ml に溶解したもの) 3ml を加え、続けて  $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。2 時間後、遠心操作 ( $4000\text{g} \times 20$  分) により菌体を集め、50ml の溶解バッファー (10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、30mM NaCl、0.25% Tween20, pH7.0) を加えた。よく懸濁し、 $-80^\circ\text{C}$  で 18 時間凍結後、ソニケーション (BRANSON 社: SONIFIER250) し、菌体を粉碎した。0.5M になるように NaCl を加え、遠心操作 ( $10000\text{g} \times 30$  分) により上清を集めた。上清に 200ml の 0.25% Tween20/カラムバッファーを加え、あらかじめ 0.25% Tween20/カラムバッファー (0.25% Tween20、10mM リン酸、0.5M NaCl, pH7.2) で平衡化したアミロース樹脂 30ml を充填したカラムにロードした。1ml/分の流速で、100ml の 0.25% Tween20/カラムバッファー、次に 150ml のカラムバッファーで洗った後、マルトースを 10mM になるように加えたカラムバッファー、50ml でアミロース樹脂に結合した融合蛋白質を溶出した。これを限外濾過器 (Amicon stirred-cell concentrator) で約 1mg/ml まで濃縮し濃縮融合蛋白質 MBP-メグー 3 とした。

融合しているマルトース結合蛋白質は以下の方法で酵素により切断除去できる。蛋白質溶液を透析チューブ (分画分子量 3,500) に入れファクターXa バッファー (20mM Tris·Cl、100mM NaCl、2mM  $\text{CaCl}_2$ 、1mM アジ化ナトリウム) に対して透析する。透析した溶液  $200 \mu\text{l}$  (1mg/ml) に  $10 \mu\text{l}$  のファクターXa ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) を加え、24 時間、室温で反応することにより、マルトース結合蛋白質と目的とする蛋白質との結合部位を特異的に切断する。切断後、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどで精製をおこなうことにより目的とする蛋白質が得られる。

【実施例 10】 MBP-メグー 3 に対するポリクローナル抗体の製造

実施例 9 で得られた濃縮融合蛋白質 MBP-メグー 3 (10mM リン酸ナトリウム、

0.5M NaCl、10mM マルトース) を等量のフロインド完全アジュバントと混合し、充分乳化した。この乳液0.5ml を、ニュージーランドホワイトウサギ(雌、約4000g) の皮下に投与した(20  $\mu$ g/匹)。1回目免疫後、フロインド不完全アジュバントと混合したMBP-メグー3で、3週間後(50  $\mu$ g/匹)、5週間後(50  $\mu$ g/匹)、7週間後(50  $\mu$ g/匹)、9週間後(100  $\mu$ g/匹)、11週間後(200  $\mu$ g/匹)に追加免疫した。3回目の免疫後、1週間後に試験採血を行い、抗体価を測定した結果、204800倍に上昇していることを確認した。抗体価の測定は、抗原50ng/ウェルを固相化した96穴プレートを用いたEIAによって行った。連続的に希釈した抗血清を各ウェルに100  $\mu$ lづつ加えて一次反応を行い、上清除去、洗浄後、抗ウサギIgG Fab'-HRP (IBL、日本)を反応させ、洗浄後、OPD (Sigma, USA)で発色して測定した。また、得られた抗血清は、ウェスタンブロットにより、MBP-メグー3と特異的に反応することを確認した。

〔実施例11〕 ウサギポリクローナル抗MBP-メグー3 IgGの反応性の検討  
MBP-メグー3、3末端c-myc付加メグー3、並びにMBP単独発現大腸菌破碎液を抗原として用い、MBP-メグー3を免疫原とするウサギIgGの反応性を確認した。

MBP-メグー3には、pMALc2/meg3で形質転換した大腸菌JM109の細胞破壊液を用いた。また3末端c-myc付加メグー3の発現には、アンチセンスプライマーとしてPCR A1プライマーに代えてストップコドンを除いてEcoRI認識配列を加えたプライマー(5'-GCCAATTCGAACTCAGTCTGCACCCCTGC-3'/配列番号:8)を用い、実施例9と同様の操作で合成した断片を用いた。この断片を、EcoRIで消化したほ乳類細胞発現用pcDNA3.1 (Invitrogen)に挿入し、プラスミドとウサギ網状赤血球を用いてin vitro transcription and translation (Promega)によって発現させてc-myc付加メグー3とした。

それぞれのタンパク質溶液を等量のサンプルバッファー(0.25%トリス-HCl、2%SDS、30%グリセリン、10% $\beta$ -メルカプトエタノール、0.

0.25%ブロモフェノールブルー) (第一化学薬品製) で処理し、5分間95℃で加熱して試料とした。得られた試料を、ゲル濃度4-20%のグラジエントゲル (第一化学薬品製) を用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) (Laemmli, U.K., Nature, 第227巻, 680-685頁, 1970年) により分離した。

SDS-PAGEで分離したタンパク質を、ブロッティング溶液 (25mM トリス-HCl, 192mM グリシン, 20%メタノール, pH8.3) を用いて100Vの定電圧で1時間、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (バイオ・ラッド製) にブロッティングした。ブロッティングしたPVDF膜を蒸留水で洗浄後、5%ブロックエースのTTBS溶液中で3時間ブロッキングした。次に、PVDF膜をTTBS (20mM トリス, 500mM のNaCl, 0.05% Tween 20, pH7.5) で洗浄した後、TTBSで希釈した1次抗体であるウサギポリクローナル抗MBP-メグー3 IgGの溶液と4℃で一夜反応させた。次に、アンプリファイドアルカリフォスファターゼイミュンブロットキット (バイオ・ラッド製) を用いて検出した。すなわち、TTBSで希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間インキュベートした後、あらかじめ室温でストレプトアビジンとビオチン標識アルカリフォスファターゼを1時間インキュベートして調製したストレプトアビジン-ビオチン標識アルカリフォスファターゼのコンプレックスを反応させた。PVDF膜をTTBSで洗浄し、基質 (nitro blue tetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine 塩の溶液) と室温で約30分間インキュベートすることにより、1次抗体に結合された抗体を可視化した。蒸留水で十分反応させることにより、反応を停止させた。

結果を図1に示した。実施例10で得た本発明によるMBP-メグー3に対するポリクローナル抗体で、MBP-メグー3に相当するバンドが確認できた。したがってこのポリクローナル抗体は、メグー3を特異的に認識する抗体であることが示された。

### 〔実施例 1 2〕 メグー 3 の細胞内局在

EcoR I 断片メグー 3 の ORF フラグメントを挿入した前記 pcDNA3.1 を CHO に形質転換し、3 末端 c-myc 付加メグー 3 を高発現させた。その 2 日後の細胞を 4% パラホルムアルデヒド、0.5% Triton X-100 で固定し、抗マウス c-myc 抗体と反応させ、FITC 標識抗マウス抗体を反応させた。更にヘキスト 33341 で核染色し、共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。

結果は図 2 に示した。アミノ酸配列の解析で推測されたとおりメグー 3 は細胞質に局在することが確認された。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、メサングウム細胞に高頻度に発現している DNA と、この DNA がコードするタンパク質等が提供された。これらはメサングウム細胞に特異的な生理活性に深く関与していると推測され、メサングウム細胞の同定、メサングウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサングウム細胞の機能が明らかになり、メサングウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサングウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

具体的には、たとえばメグー 3 の人為的な調節によって、糸球体腎炎の発症や進展を制御できる可能性がある。あるいはメサングウム細胞や体液中のメグー 3 タンパク質や mRNA の定量によって、糸球体腎炎などの腎疾患の診断が可能となることが期待できる。糸球体腎炎ではメサングウム領域の機能異常が見られ、メサングウム細胞の増殖、あるいは細胞からのマトリックス基質の産生亢進が起きている。これらの病態にメグー 3 が関与している可能性は十分に考えられる。

本発明によるメグー 3 は、メサングウム細胞で高度に発現しているという点では、本発明者が先に報告したメグシンと共通の特徴を備えている。しかしながら本発明によるメグー 3 は proline rich ドメインを有する細胞内シグナル伝達系物

質である可能性が示唆されるのに対して、メグシンはプロテアーゼインヒビターである SERPIN スーパーファミリーとの相同性を持つタンパク質である。また本発明によるメグー 3 が比較的広範囲な組織において発現が観察されている点は、メグシンのメサンギウム細胞に特異的に発現しているという特徴と相違する。したがって本発明によるメグー 3 は、メサンギウム細胞の機能を支える重要なタンパク質である可能性を持っている。このような重要なタンパク質の存在を明らかにした本発明の意義は大きい。

## 請求の範囲

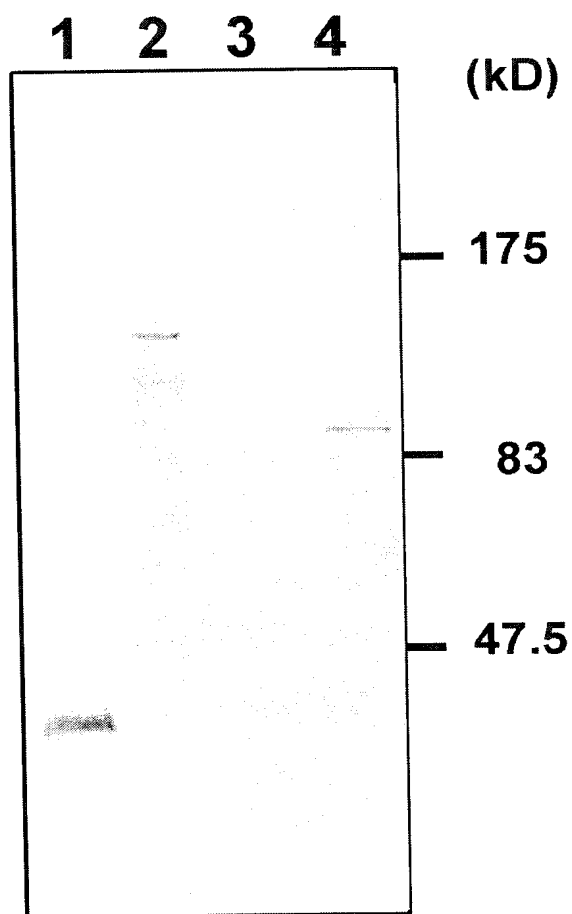
1. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
2. 配列番号：2のアミノ酸配列を含む請求項1のタンパク質。
3. 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 配列番号：1の塩基配列を含む請求項3記載のDNA。
5. 配列番号：1の塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、請求項1に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。
6. 請求項4に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。
7. 請求項4に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。
8. 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。
9. 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。
10. 請求項9に記載の形質転換細胞を培養し、請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質の製造方法。
11. 請求項6のDNAを含むメサンギウム細胞の検出用試薬。
12. 請求項1に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。
13. 配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する請求項12の抗体。

14. 抗体がモノクローナル抗体である請求項13の抗体。
15. 請求項13または請求項14のいずれかに記載の抗体と請求項2のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項2のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。
16. 請求項12～請求項14のいずれかに記載の抗体を含む、メサングウム細胞の検出用試薬。
17. 生体試料中に含まれる請求項2のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。
18. メグー3をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
19. 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項18のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
20. メグー3をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項19のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。



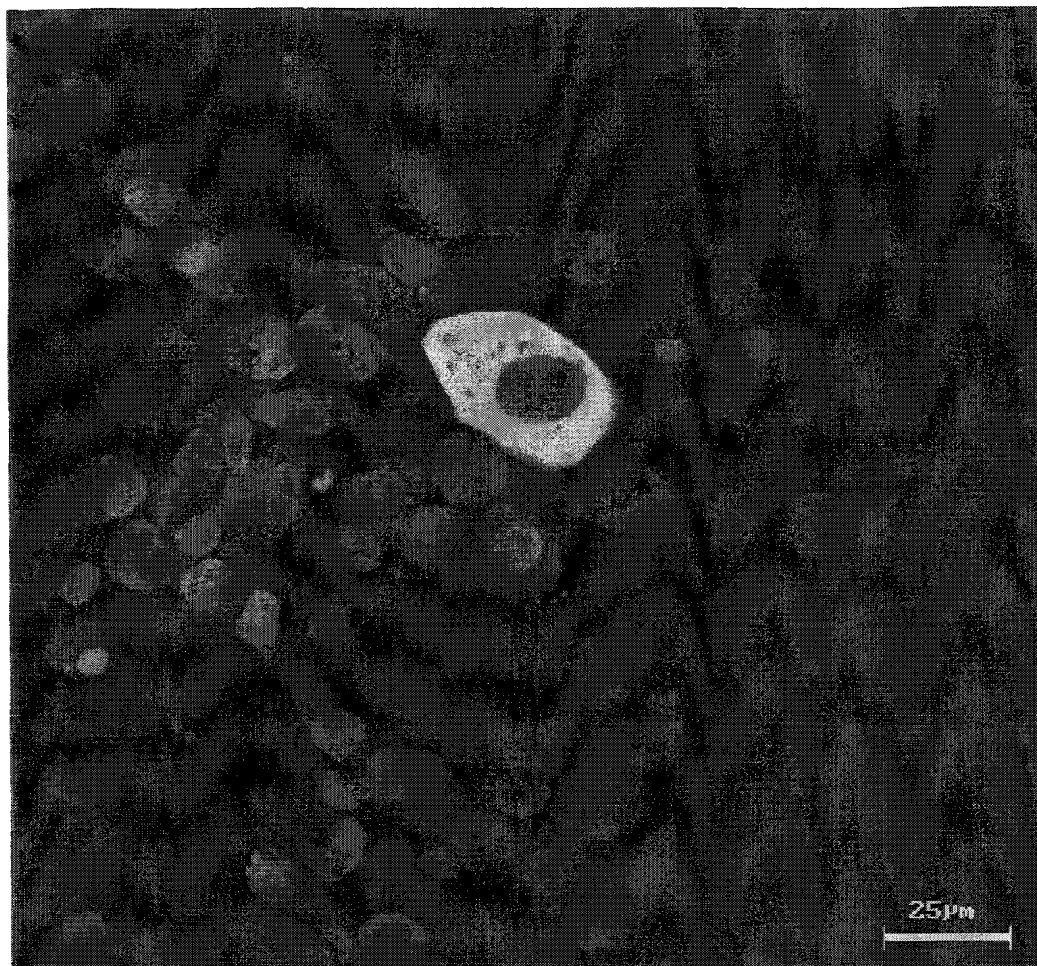
1 / 2

☒ 1



2 / 2

図 2



## SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio

KUROKAWA, Kiyoshi

<120> Meg-3 protein

<130> KRK-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-123561

<151> 1999-04-30

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (53)..(2251)

<400> 1

caggaactgg gccagctccg gtcccttccct tttaggggcctc tcactctgga gg atg ggg 58

Met Gly

1

tgg atg gga gaa aaa acc ggg aag atc ctg acg gag ttc ctc cag ttc 106

Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu Gln Phe

5

10

15

tat gaa gac cag tat ggc gtg gct ctc ttc aac agc atg cgc cat gag 154

Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg His Glu

20

25

30

att gag ggc acg ggg ctg ccg cag gcc cag ctg ctc tgg cgc aag gtg 202

Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg Lys Val

35

40

45

50

cca ctg gac gag cgc atc gtc ttc tcg ggg aac ctc ttc cag cac cag 250

Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln His Gln

55

60

65

gag gac agc aag aag tgg aga aac cgc ttc agc ctc gtg ccc cac aac 298

Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro His Asn

70

75

80

tac ggg ctg gtg ctc tac gaa aac aaa gcg gcc tat gag cgg cag gtc 346  
Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg Gln Val  
85 90 95

cca cca cga gcc gtc atc aac agt gca ggc tac aaa atc ctc acg tcc 394  
Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Ser  
100 105 110

gtg gac caa tac ctg gag ctc att ggc aac tcc tta cca ggg acc acg 442  
Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly Thr Thr  
115 120 125 130

gca aag tcg ggc agt gcc ccc atc ctc aag tgc ccc aca cag ttc ccg 490  
Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln Phe Pro  
135 140 145

ctc atc ctc tgg cat cct tat gcg cgt cac tac tac ttc tgc atg atg 538  
Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys Met Met  
150 155 160

aca gaa gcc gag cag gac aag tgg cag gct gtg ctg cag gac tgc atc 586  
Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp Cys Ile  
165 170 175

cgg cac tgc aac aat gga atc cct gag gac tcc aag gta gag ggc cct 634

Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu Gly Pro	
180	185 190
gcg ttc aca gat gcc atc cgc atg tac cga cag tcc aag gag ctg tac	682
Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu Leu Tyr	
195	200 205 210
ggc acc tgg gag atg ctg tgt ggg aac gag gtg cag atc ctg agc aac	730
Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu Ser Asn	
	215 220 225
ctg gtg atg gag gag ctg ggc cct gag ctg aag gca gag ctc ggc ccg	778
Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu Gly Pro	
	230 235 240
cgg ctg aag ggg aaa ccg cag gag cgg cag cgg cag tgg atc cag atc	826
Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile Gln Ile	
	245 250 255
tcg gac gcc gtg tac cac atg gtg tac gag cag gcc aag gcg cgc ttc	874
Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala Arg Phe	
	260 265 270
gag gag gtg ctg tcc aag gtg cag cag gtg cag ccg gcc atg cag gcc	922
Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met Gln Ala	
	275 280 285 290

gtc atc cga act gac atg gac caa att atc acc tcc aag gag ctc ctt 970  
Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu Leu Leu  
295 300 305

gcc agc aag atc cga gcc ttc atc ctc ccc aag gca gag gtg tgc gtg 1018  
Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val Cys Val  
310 315 320

cgg aac cat gtc cag ccc tac atc cca tcc atc ctg gag gcc ctg atg 1066  
Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala Leu Met  
325 330 335

gtc ccc acc agc cag ggc ttc act gag gtg cga gat gtc ttc ttc aag 1114  
Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe Phe Lys  
340 345 350

gag gtc acg gac atg aac ctg aac gtc atc aac gag ggc ggc att gac 1162  
Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly Ile Asp  
355 360 365 370

aag ctg ggc gag tac atg gag aag ctg tcc cgg ctg gcg tac cac ccc 1210  
Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr His Pro  
375 380 385

ctg aag atg cag agc tgc tat gag aag atg gag tcg ctg cga ctg gac 1258

Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg Leu Asp

390

395

400

ggg ctg cag cag cga ttt gat gtg tcc agc acg tcc gtg ttc aag cag 1306

Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe Lys Gln

405

410

415

cga gcc cag atc cac atg cgg gag caa atg gac aat gcc gtg tat acg 1354

Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val Tyr Thr

420

425

430

ttc gag acc ctc ctg cac cag gag ctg ggg aag ggg ccc acc aag gag 1402

Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr Lys Glu

435

440

445

450

gag ctg tgc aag tcc atc cag cgg gtc ctg gag cgg gig ctg aaa aaa 1450

Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu Lys Lys

455

460

465

tac gac tac gac agc agc tct gtg cgg aag agg ttc ttc cgg gag gcg 1498

Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg Glu Ala

470

475

480

ctg ctg cag atc agc atc ccg ttc ctg ctc aag aag ctg gcc cct acc 1546

Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala Pro Thr

485

490

495



tgc aag tgc gag ctg ccc cgg ttc cag gag ctg atc ttc gag gac ttt 1594  
Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu Asp Phe  
500 505 510

gcc agg ttc atc ctg gtg gaa aac acg tac gag gag gtg gtg ctg cag 1642  
Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val Leu Gln  
515 520 525 530

acc gtc atg aag gac atc ctg cag gct gtg aag gag gcc gcg gtg cag 1690  
Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala Val Gln  
535 540 545

agg aag cac aac ctc tac cgg gac agc atg gtc atg cac aac agc gac 1738  
Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn Ser Asp  
550 555 560

ccc aac ctg cac ctg ctg gcc gag ggc gcc ccc atc gac tgg ggc gag 1786  
Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp Gly Glu  
565 570 575

gag tac agc aac agc ggc ggg ggc ggc agc ccc agc ccc agc acc ccg 1834  
Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro  
580 585 590

gag tca gcc acc ctc tgc gaa aag cga cgg cgc gcc aag cag gtg gtc 1882

Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln Val Val  
 595 600 605 610

tct gtg gtc cag gat gag gag gtg ggg ctg ccc ttt gag gct agc cct 1930  
 Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala Ser Pro  
 615 620 625

gag tca cca cca cct gcg tcc ccg gac ggt gtc act gag atc cga ggc 1978  
 Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile Arg Gly  
 630 635 640

ctg ctg gcc caa ggt ctg cgg cct gag agc ccc cca cca gcc ggc ccc 2026  
 Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Gly Pro  
 645 650 655

ctg ctg aac ggg gcc ccc gct ggg gag agt ccc cag cct aag gcc gcc 2074  
 Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys Ala Ala  
 660 665 670

ccc gag gcc tcc tcg ccg cct gcc tca ccc ctg cag cat ctg ctg cct 2122  
 Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu Leu Pro  
 675 680 685 690

gga aag gct gtg gac ctt ggg ccc ccc aag ccc agc gac cag gag act 2170  
 Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln Glu Thr  
 695 700 705

gga gag cag gtg tcc agc ccc agc agc cac ccc gcc ctc cac acc acc 2218

Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His Thr Thr

710

715

720

acc gag gac agt gca ggg gtg cag act gag ttc taggccagtg ggccctgac 2271

Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe

725

730

tgtgtcacat ggcacaggcc gtcccttcc ggaccagge aggcacagct ctggggaggg 2331

cacctgggtc tgtccttgt gggtggaggc ggggcagggc tgtgtggcac cgccaggag 2391

cgggcccacc tgagtcactt tattgggttc agtcaacact ttcttgctcc ctgtttctc 2451

ttctgtggga tgatctcaga tgcaggggct ggttttgggg ttctccgtct tggccaagg 2511

gctggacact gctggggggc tggaaagccc ctcccttcc gtccctcgtt ggctccatc 2571

ccctcatggg tgcctccatc ctccctggag agaggagggt gaaagctggg gtgagcccag 2631

tgggttcccg cccactcacc caggagctgg ctgggccagg accgggagag ggagcactgc 2691

tgcctctctg gccctgctcc ttccgcagtt aggggtggac cgagccctgc ttccccact 2751

gtcttgagg gaaggggaag gagggggctc tcaggctgga gccaggtgg gggctgtgg 2811

tggagagatg agatttaggg ggigccctcat ggggtgggca ggcciggggt gaaatgagaa 2871

aggcccagaa cgtgcaggtc tgcggagggg aagtgtccig agtgaaggag gggaccccat 2931

cciggggatg ctgggagtga gtgagtgaga tggctgagtg agggttatgg ggagccigag 2991

gttttatggg cctgtgtatc ccttctccc ggccccagcc tgcctccctc ctgcccgcct 3051

ggcccacagg tctccctctg gtccctgtcc ctctgggtgt tggggatgga gcggcagcaa 3111

ggggtgtaat ggggctgggt tctgtcttct acaggccacc ccgaggctct cagtgggtgc 3171

ctggggagcc ggacggggct cctgaggggt acaggttggg tgggcccctc ctgagggtct 3231

ggggtcaggc ttggcctct gtgtccctc agtcaccaag tcacctccct ctgaaaaatc 3291

agtccttct ttggatgtcc ttgtgagta ctctgggctt ggcgtgtctt cctctcagc 3351

ttcttgttcc tgggacaagg gtaagccag gatgggccc ggcgtgggt ccccccccc 3411

aggacccac agggccctc ccttcttct ttgcgggggg cagggcagaa atggactct 3471

tttgggtccc cgagggtggg tccccccca gcccgtcctt ctccgtgccc tagacctgt 3531

ccccagagga ggggccccta cccacaggaa gtgtgggtgc gcttggcaat cagggacccc 3591

cagctgccgc agccctgggt ttigggcgc attttccctc ttgtcccgaa gatttgcgcc 3651

tttagtgcct tttaggggt tccatcacc cctccctgat attgtattga aaatattatg 3711

cacactgttc atgcttttac taatcaataa acgctttatt taaaaaaaaa aaaaaaa 3768

<210> 2

<211> 733

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu

1

5

10

15

Gln Phe Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg

20

25

30

His Glu Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg

35

40

45

Lys Val Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln

50

55

60

His Gln Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro  
65 70 75 80

His Asn Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg  
85 90 95

Gln Val Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu  
100 105 110

Thr Ser Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly  
115 120 125

Thr Thr Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln  
130 135 140

Phe Pro Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys  
145 150 155 160

Met Met Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp  
165 170 175

Cys Ile Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu  
180 185 190

Gly Pro Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu  
195 200 205

Leu Tyr Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu

210

215

220

Ser Asn Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu

225

230

235

240

Gly Pro Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile

245

250

255

Gln Ile Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala

260

265

270

Arg Phe Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met

275

280

285

Gln Ala Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu

290

295

300

Leu Leu Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val

305

310

315

320

Cys Val Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala

325

330

335

Leu Met Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe

340	345	350
Phe Lys Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly		
355	360	365
Ile Asp Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr		
370	375	380
His Pro Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg		
385	390	395
		400
Leu Asp Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe		
405	410	415
Lys Gln Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val		
420	425	430
Tyr Thr Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr		
435	440	445
Lys Glu Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu		
450	455	460
Lys Lys Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg		
465	470	475
		480



Glu Ala Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala

485

490

495

Pro Thr Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu

500

505

510

Asp Phe Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val

515

520

525

Leu Gln Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala

530

535

540

Val Gln Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn

545

550

555

560

Ser Asp Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp

565

570

575

Gly Glu Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser

580

585

590

Thr Pro Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln

595

600

605

Val Val Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala

610

615

620

Ser Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile

625

630

635

640

Arg Gly Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala

645

650

655

Gly Pro Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys

660

665

670

Ala Ala Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu

675

680

685

Leu Pro Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln

690

695

700

Glu Thr Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His

705

710

715

720

Thr Thr Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe

725

730

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Probe Sequence

<400> 5

tacctggagc tcattggcaa ctcccttacca

30

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

cggaattcat ggggtggatg gg

22

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gcgaattcta gaactcagtc tgcacccctg c

31

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gcgaattcga actcagtcctg caccctgc

29

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02831

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YOSHINARI YASUDA, et al., "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells", Kidney International(1998), Vol.53, No.1, pp.154-158	1-20
Y	Toshio Miyata, et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", J. Clin. Invest. (1998), Vol.102, No.4, pp.828-836	1-20
P, X	WO, 99/33981, A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC), 08 July, 1999 (08.07.99), SEQ ID NO:24 (Family: none)	6, 11
A	EP, 780472, A2 (Hsp Research Institute, Inc.), 25 June, 1997 (25.06.97), pp.13-15 SEQ ID NO:2 2945-2959bp & JP, 10-84971, A pp.11-13, arrangement No.:2 2945-2959bp & AU, 7423796, A & CN, 1158896, A	6, 11
P, A	Norio Terada et al., "Zou Chikkan no Bunshi Igaku, Kanzou Byou to Signal Dentatsu", Gengai Iryo,	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 August, 2000 (02.08.00)

Date of mailing of the international search report  
15 August, 2000 (15.08.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02831

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	March 2000, Vol.32, No.3, pp.745-750	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YOSHINARI YASUDA, et al., "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells", Kidney International(1998), Vol. 53, No. 1, p. 154-158	1-20
Y	Toshio Miyata, et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", J. Clin. Invest. (1998), Vol. 102, No. 4, p. 828-836	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.08.00	国際調査報告の発送日 15.08.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進	4B 2936
電話番号 03-3581-1101		内線 3448



C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/33981, A2 (INCYTE PHARMATICALS, INC), 8. 7月. 1999 (08. 07. 99), SEQ ID NO:24 (ファミリーなし)	6, 11
A	EP, 780472, A2 (Hsp Research Institute, Inc.) 25. 6月. 1997 (25. 06. 97), p. 13-15 SEQ ID NO:2 2945-2959bp &JP, 10-84971, A, p. 11-13 配列番号:2 2945-2959bp &AU, 7423796, A & CN, 1158896, A	6, 11
P, A	寺田典生 外著, 「腎疾患の分子医学 腎臓病とシグナル伝達」, 現代医療, 2000年3月, 第32巻, 第3号, p. 745-750	1-20